

Title	Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection
Author(s)	吉村, 雅史
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40375">https://hdl.handle.net/11094/40375</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	吉 村 雅 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 8 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase III gene transfection ( <i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素 III の遺伝子導入による B16マウスメラノーマの肺転移の抑制に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 沢 佑 次 (副査) 教 授 瀨 岡 利 之    教 授 谷 口 直 之

## 論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】 細胞表面の糖鎖は癌化やウイルスによる形質転換に伴い変化するが、アスパラギン結合型糖鎖の一つである  $\beta$ 1-6糖鎖、およびその糖鎖を合成する  $\beta$ 1-6*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-V) の活性が転移能と相関することが報告されている。一方  $\beta$ 1-4*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-III) はアスパラギン結合型糖鎖に bisecting *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加する糖転移酵素であるが、bisecting GlcNAc をもつ糖鎖に対して GnT-V は作用しにくくなり、 $\beta$ 1-6糖鎖が減少することが知られている。本研究は経静脈的肺転移モデルであるマウスメラノーマ細胞株 B16-hm に GnT-III 遺伝子を導入、発現させ、GnT-V と拮抗することによりその転移能への影響を明らかにし、あわせて細胞生物学的な因子が受ける影響を明らかにすることを目的とする。

【方法ならびに成績】 1. GnT-III 遺伝子導入と糖鎖変化。アクチンプロモーターを持つベクター pCAGGS のクローニング部位にラット GnT-III の cDNA を取り組み、これを GnT-III 発現ベクターとした。低転移性マウス B16-F1メラノーマを経静脈的に投与し、形成される肺転移巣から細胞を単離する操作を 2 回繰り返すことで高転移性細胞株 B16-hm を樹立した。B16-hm に GnT-III 発現ベクターを導入し、高活性の GnT-III を発現するクローンを得た。一方 B16-hm やベクターのみを導入したクローンでは GnT-III 活性は検出されなかった。L-PHA レクチンは  $\beta$ 1-6糖鎖に親和性を示すが、bisecting GlcNAc があると結合は著しく減少する。一方 E-PHA レクチンは bisecting GlcNAc に強い親和性を示すが  $\beta$ 1-6糖鎖には強い親和性を持たない。そこで、GnT-III 高発現クローンから可溶性膜蛋白を調製し L-PHA や E-PHA の親和性を検討したところ、B16-hm や GnT-III のないベクターを導入したクローンに比較して GnT-III 高発現クローンでは L-PHA の結合が低下しているのに対し、E-PHA の結合は増加していることが示され、導入した GnT-III により細胞膜蛋白で bisecting GlcNAc が増加し、細胞表面の  $\beta$ 1-6糖鎖の合成が抑制されていることがわかった。

2. GnT-III と肺転移。転移に対する GnT-III の発現の影響を解析する目的で同種マウスに経静脈的に細胞を注入し、21日後に肺に形成される転移コロニーをカウントした。B16-hm やベクターのみを導入したクローンに比較して肺転移数は GnT-III 発現クローンで抑制された。またヌードマウスでの経静脈的肺転移も同種マウスと同様 GnT-

III 発現クローンで有意に抑制され、転移の抑制が細胞性免疫による腫瘍細胞の排除によるものとの可能性は否定的であった。

3. GnT-III と細胞浸潤、接着。癌の転移能は、基底膜への浸潤能、細胞外マトリックスへの接着、細胞増殖の速度の影響を受けるため、これらについて、GnT-III の発現の影響を検討した。マウス EHS サルコーマ細胞が分泌する基底膜蛋白であるマトリゲルを固相化した Boyden chamber を用いて浸潤能を検討したところ、GnT-III 発現クローンで浸潤能は有意に抑制された。細胞外マトリックスとしてコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンへの接着の時間経過を調べたところ、GnT-III 発現クローンは、コラーゲン、ラミニン、に対する接着が B16-hm やベクターのみを導入したクローンに比較して遅延した。増殖速度はクローン間で差はみられず、転移抑制が増殖の差異によるものではないと考えられた。

【総括】 マウスメラノーマ細胞での検討において、内在性の GnT-V と遺伝子導入で発現された GnT-III との競合の結果、 $\beta$ 1-6糖鎖が減少し、癌細胞の浸潤能や接着能が抑制され、肺転移の抑制につながる可能性が示された。本研究では、新たに遺伝子導入という方法を用いて、転移における  $\beta$ 1-6構造を持つ糖鎖の原因的役割を明らかにした。この方法が将来、癌の臨床においても転移の抑制や治療に応用される可能性があるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

多くの生物学的な現象で糖鎖の関与が次第に明らかにされつつあるが、癌転移における役割は、sialyl-Lewis<sup>x</sup> 等を除く多くの糖鎖でなお不明な点が多い。本論文では、肺高転移性を示すマウスメラノーマ細胞株 B16-hm に  $\beta$ 1-4N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-III) 遺伝子を導入、発現させることにより、癌細胞の表面糖鎖構造、転移能、浸潤能、接着能、細胞形態が GnT-III の発現により受ける影響について検討した。

B16-hm やベクターのみを導入した control transfectant など、GnT-III 活性の検出されないコントロールに比較して、GnT-III cDNA を導入後、高活性の GnT-III を発現する positive transfectant では、(1)細胞膜蛋白の bisecting N-アセチルグルコサミンの増加と  $\beta$ 1-6糖鎖の減少、(2)経静脈投与後の肺転移の抑制、(3)Matrix metalloproteinase-9 の抑制によるマトリゲルへの細胞浸潤能の低下、(4)コラーゲン、ラミニンへの接着の抑制、(5)E-cadherin の培養上清中への放出の減少による、細胞表面での E-cadherin の発現の増加による細胞形態の変化、が観察された。これらの結果から、糖鎖合成を触媒する酵素の遺伝子導入、活性発現により糖鎖がリモデリングを受け、転移の抑制、浸潤能や接着能の抑制、細胞形態の変化がもたらされることが示された。本研究は糖転移酵素遺伝子の導入、発現という新たな方法を用いて、糖鎖付加という翻訳後修飾によっても癌細胞の生物学的な性質の制御が可能であることを初めて明らかにした点で意義の深いものと考えられる。さらに、本研究の成果が遺伝子治療を用いた癌の転移の制御に応用されうるものと考えられ、癌治療の新たなアプローチを示した点で価値のあるものと考えられ、学位の授与に値するものと認める。